

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-074835

(43)Date of publication of application : 14.03.2000

(51)Int.Cl.

G01N 21/64
G01N 27/447

(21)Application number : 10-245342

(71)Applicant : HITACHI ELECTRONICS ENG CO
LTD

(22)Date of filing : 31.08.1998

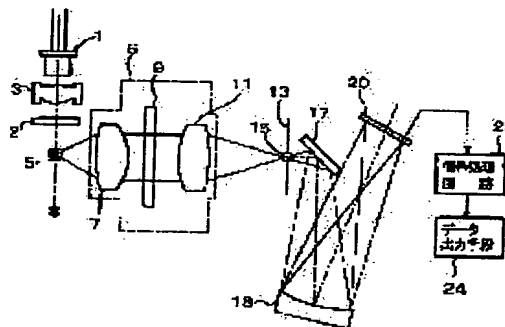
(72)Inventor : MIYAZAKI YUSUKE
KOIZUMI MITSUYOSHI

(54) DNA BASE SEQUENCE DETERMINATION DEVICE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To make the wavelength of the exciting laser beam generated from an LD constant by arranging a short pass filter between a laser diode light source and a gel electrophoresis means.

SOLUTION: As an exciting light emitting light source, an LD 1 is used instead of gas laser. The exciting light emitted from the LD 1 is focused at a prescribed position of a migration means 5 by a condenser lens 3. A short pass filter 2 is arranged between the condenser lens 3 and the migration means 5. The arrangement position of the short pass filter 2 is not limited, and it may be arranged in any position between the LD 1 and the condenser lens 3. The short pass filter 2 has the function of cutting the exciting light of a long wavelength of the exciting laser beam generated from the LD 1 and passing only the exciting light having a desired wavelength of 637 nm. Actually, the short pass filter 2 exhibits the function of transmitting 90% or more the exciting light having the desired constant wavelength of 637 nm but transmitting only about 0.01% the exciting light having a wavelength longer than it.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2000-74835
(P2000-74835A)

(43)公開日 平成12年3月14日(2000.3.14)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード*(参考)
G 0 1 N 21/64		G 0 1 N 21/64	2 G 0 4 3
27/447		27/26	3 1 5 K
			3 2 5 E
			3 2 5 A

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 6 頁)

(21)出願番号 特願平10-245342

(22)出願日 平成10年8月31日(1998.8.31)

(71)出願人 000233480

日立電子エンジニアリング株式会社
東京都渋谷区東3丁目16番3号

(72)発明者 宮崎 祐輔

東京都渋谷区東3丁目16番3号 日立電子
エンジニアリング株式会社内

(72)発明者 小泉 光義

東京都渋谷区東3丁目16番3号 日立電子
エンジニアリング株式会社内

(74)代理人 100079555

弁理士 梶山 信是 (外1名)

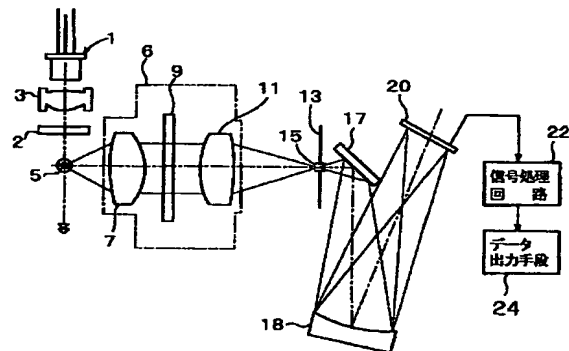
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 DNA塩基配列決定装置

(57)【要約】

【課題】 レーザダイオード(LD)から発生される励起用レーザ光の波長を一定にするための新規な機構を有するDNA塩基配列決定装置を提供する。

【解決手段】 蛍光標識されたDNA断片用の泳動路を有するゲル電気泳動手段と、該電気泳動手段の泳動路にレーザ光を照射する光励起用のレーザダイオード光源と、レーザ光により照射されたDNA断片から発生された蛍光を検出して電気信号に変換するCCDセンサとからなるDNA塩基配列決定装置において、前記レーザダイオード光源とゲル電気泳動手段との間で、レーザダイオード光源と電気泳動手段との光軸上にショートパスフィルタを配設する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 蛍光標識されたDNA断片用の泳動路を有するゲル電気泳動手段と、該電気泳動手段の泳動路にレーザ光を照射する光励起用のレーザダイオード光源と、レーザ光により照射されたDNA断片から発生された蛍光を検出して電気信号に変換するCCDセンサとからなるDNA塩基配列決定装置において、前記レーザダイオード光源とゲル電気泳動手段との間で、レーザダイオード光源と電気泳動手段との光軸上にショートパスフィルタが配設されていることを特徴とするDNA塩基配列決定装置。

【請求項2】 前記レーザダイオード光源と前記ショートパスフィルタとの間で、レーザダイオード光源と前記ショートパスフィルタとの光軸上に蛍光集光用レンズが更に配設されていることを特徴とする請求項1に記載のDNA塩基配列決定装置。

【請求項3】 前記ゲル電気泳動手段は、単一の中空状キャピラリであり、ゲル電気泳動手段とCCDとの間にロングパスフィルタが更に配設されており、前記ロングパスフィルタの前には第1のレンズが配設され、ロングパスフィルタの後には第2のレンズが配設され、該第2のレンズを透過した蛍光はスリットの開口部を通過して反射ミラーによりグレーティングに入射され、このグレーティングにより反射された蛍光をCCDセンサで受光することからなることを特徴とする請求項1又は2に記載のDNA塩基配列決定装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はDNA塩基配列決定装置に関する。更に詳細には、本発明は蛍光標識を用いてDNAの塩基配列を効率的に迅速に決定することのできる装置に関する。

【0002】

【従来の技術】DNA等の塩基配列を決定する方法として、ゲル電気泳動法が広く実施されている。

【0003】電気泳動する際に、従来は試料をラジオアイソトープでラベルし、分析していたが、この方法では手間と時間がかかる難点があった。更に、放射能管理の点から常に最大限の安全性と管理が求められ、特別な施設内でなければ分析を行うことができない。このため、最近では、試料を蛍光体でラベルする方式が検討されている。

【0004】光を用いる方法では、蛍光ラベルしたDNA断片をゲル中を泳動させるが、泳動開始部から、15～20cm下方に各泳動路毎に光励起部と光検出器を設けておき、ここを通過するDNA断片を順に計測する。例えば、配列を決定しようとするDNA鎖を鋳型として酵素反応（ダイデオキシ法）による操作で末端塩基種がわかった種々の長さのDNAを複製し、これらに蛍光体を標識する。つまり、蛍光体で標識されたアデニン（A）

断片群、シトシン（C）断片群、グアニン（G）断片群およびチミン（T）断片群を得る。これらの断片群を混合して電気泳動用ゲルの別々の泳動レーン溝に注入し、電圧を印加する。DNAは負の電荷を持つ鎖状の重合体高分子のため、ゲル中を分子量に反比例した速度で移動する。短い（分子量の小さい）DNA鎖ほど早く、長い（分子量の大きい）DNA鎖ほどゆっくりと移動するので、分子量によりDNAを分画できる。

【0005】特開昭63-21556号公報には、レーザで照射される電気泳動装置のゲル上のラインと光ダイオードアレイの配列方向が電気泳動装置内のDNA断片の泳動方向と直角となるように構成されたDNA塩基配列決定装置が開示されている。

【0006】図5は該装置の構成を説明する模式図である。図5の装置では、光源70から出たレーザ光はミラー72で反射され、泳動板74のゲル中の一定ポイントに横から水平にレーザ光を照射する。ゲル中を泳動してきた蛍光ラベルされたDNA断片76がこの照射領域を通過する際、このDNA断片から蛍光が順次放出される。このとき、蛍光放出の水平位置から末端塩基の種類が、また、泳動スタートからの泳動時間の差から断片の長さを、更に、発光波長で検体の識別ができる。各泳動路からの蛍光はレンズ78によりイメージインテンシファイヤ80の受光部82で結像する。この信号は増幅されて光ダイオードアレイ84で電気信号に変換されて計測される。計測結果をコンピュータ処理することによって各DNA断片の配列を計算し、目的とするDNAの塩基配列を決定する。

【0007】図5に示された装置は受光系としてイメージインテンシファイヤカメラを使用しているが、イメージインテンシファイヤカメラは非常に高価な光学装置であるばかりか、比較的大型の装置である。このため、泳動装置全体のサイズも大型化せざるを得なかった。

【0008】更に、光源としてアルゴンイオンレーザ又はヘリウム・ネオン（He-Ne）レーザなどのガスレーザ光源を使用する。これらのレーザ光源は一般的に非常に高価である。更に、ゲル側面から励起光を照射する方式のDNAシーケンサは次のような欠点を有する。①励起光のレーザビームを長い範囲にわたって細く絞れないため、空間分解能に限界がある。②これを解消するため、ビームを泳動方向に楕円形に拡げて、センサの画素で空間分解能を向上させようとしたが、ガスレーザではビームの断面形状が円形の場合が多く、ビームを楕円形に拡げるための励起光照射光学系が複雑になる。

【0009】これらの問題点を解決するため、本願発明者らは、先に、受光系としてCCDラインセンサを使用し、励起光源としてレーザダイオード（以下「LD」という）を使用することからなるDNA塩基配列決定装置を発明し、出願した（特願平8-308764号）。LDによる励起光のビーム拡がり角は7.5 x 37 (deg)

g)である。この特性値から明らかなように、レーザダイオードの発光特性は、概ね楕円形のビームを発生する。従って、断面形状が円形のビームを発生するガスレーザと異なり、レーザダイオードの場合は、ビームを楕円形にするための特別な光学手段を必要としない。また、CCDラインセンサはイメージインテンシファイヤカメラに比べて著しく小型であるばかりか、安価でもある。同様に、LDもガスレーザに比べて比較的小型であり、しかも、非常に安価である。従って、受光系としてCCDラインセンサを使用し、励起光源としてLDを使用することにより、DNA塩基配列決定装置全体のサイズを劇的に小型化できたばかりか、コストも大幅に軽減することができた。

【0010】しかし、その後更に研究を続けた結果、LDの発振波長は不安定であり、所望の特定波長を安定的に得るのが比較的困難であることが判明した。このため、LDの電流を自動出力制御機構（APC）で一定にし、さらに、LDをペルチェ素子で冷却し、2.0℃の一定温度に維持する試みが行われた。これにより、LDから発生される励起光の波長を 367 ± 1 nm以内に制御することができる。

【0011】ところが、このように電流及び温度を制御したLDを使用しても、励起光波長の367 nm近傍の波長を有する蛍光を明確に分離することができず、測定エラーの大きな原因となっていた。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的はLDから発生される励起用レーザ光の波長を一定にするための新規な機構を有するDNA塩基配列決定装置を提供することである。

【0013】

【課題を解決するための手段】前記課題は、LD光源と泳動手段との間にショートパスフィルタを配設することにより解決される。

【0014】

【発明の実施の形態】図1は本発明によるDNA塩基配列決定装置の部分概要構成図である。図1に示されるように、本発明の装置では、励起光照射光源として、ガスレーザの代わりにLD1を使用する。このLDとしては、例えば、日立製作所（株）からHL6319Gの商品名で一般に市販されているLDを使用することができる。このLDの発光波長は637 nmであり、出力は7 mWである。また、励起光のビーム拡がり角は 7.5×37 (deg)である。この特性値から明らかなように、LDの発光特性は、概ね楕円形のビームを発生する。従って、断面形状が円形のビームを発生するガスレーザと異なり、LDの場合は、ビームを楕円形にするための特別な光学手段を必要としない。前記以外の仕様を有するLDも当然本発明の装置で使用できる。

【0015】LD1から発射された励起光は集光レンズ

3により泳動手段5の所定の位置に合焦される。本発明の装置では、この集光レンズ3と泳動手段5との間にショートパスフィルタ2を配設している。ショートパスフィルタ2の配設箇所は図示された位置に限定されず、LD1と集光レンズ3との間であってもよい。ショートパスフィルタ2はLD1から発生される励起用レーザ光のうち、長波長の励起光をカットし、所望の637 nmの波長を有する励起光のみを透過させる機能を有する。実際には、ショートパスフィルタ2は所望の637 nmの波長を有する励起光を90%以上透過させ、これよりも長波長の励起光は0.01%程度しか透過させない機能を発揮する。

【0016】本発明者らが鋭意研究を続けた結果、市販のLDは637 nmの波長を有する励起光の他に、様々な波長を有する励起光を発生していることが発見された。このような励起光のうち、637 nmよりも長波長の励起光（例えば、波長650 nmの励起光）は迷光化すると、650 nmの波長を有する蛍光と分離することが困難となり、測定エラーを引き起こす恐れがある。従って、このショートパスフィルタ2で637 nm以下の波長を有する励起光のみを透過させ、これよりも長波長の励起光をカットすることが好ましい。

【0017】図1に図示された泳動手段5は単一の中空状キャピラリーであるが、複数本の中空状キャピラリー又は従来の平板型の泳動板でもよい。複数本の中空状キャピラリーを同一直線上に配列させてレーザ光を照射するDNA塩基配列決定装置は特開平5-72177号公報に開示されている。また、励起光源にLDを使用し、泳動手段として平板型の泳動板を使用したDNA塩基配列決定装置は本願出願人による特願平8-308764号明細書に開示されている。

【0018】この泳動手段5の内部の蛍光標識DNA断片サンプルに励起光が照射されると、使用されている蛍光標識から特定の波長の蛍光が発生される。例えば、DNA断片を標識するための蛍光標識として、FITC（イソチオシアン酸フルオレセイン）、EITC（イソチオシアン酸エオシン）、TMRITC（イソチオシアン酸テトラメチルローダミン）、XRITC（置換イソチオシアン酸ローダミン）などが使用されている。その他の蛍光標識も当然使用できる。

【0019】蛍光標識から発生された蛍光は蛍光集光系6により集光される。蛍光はまず、第1のレンズ7により集光され、更に平行光に変えられて、ロングパスフィルタ9を通過する。ロングパスフィルタ9は、波長650 nm超の波長を有する蛍光のみを透過させ、蛍光と共に入射してくる波長650 nm未満の迷光（例えば、波長637 nmの励起光の散乱光）をカットするために使用されている。

【0020】ロングパスフィルタ9を透過した蛍光は第2のレンズ11により再び合焦される。合焦点は例え

ば、図1におけるスリット13の開口部15の略中央部である。合焦された蛍光はミラー17で反射され、グレーティング18に入射され、このグレーティング18で再び反射され、最後にCCDセンサ20に入射される。図1に示された装置で使用するグレーティング18は、光の回折を利用し、分光、波長選別、あるいは光偏光などを行う光学部材であり、平面あるいは凹面の基板上に周期的な凸凹構造を持たせたものである。その他の構造の回折格子などもグレーティング18として使用できる。

【0021】CCDセンサ20は当業者に公知である。本発明の装置で使用するCCDセンサ20は例えば、512x64ピクセルのものであり、使用時には、当業者に公知慣用の手段（例えば、ヘルチェ素子）で例えば、-10℃にまで冷却される。

【0022】CCDセンサ20で検出された蛍光は信号処理回路22に送られ、検出された蛍光の波長は画素位置に対応して検出され、A/D変換などの当業者に公知の信号処理を受け、それぞれA、T、C、Gに換算されて適当なデータ出力手段24（例えば、CRT及び又はプリンタ）により出力され、DNA断片の塩基配列が決定される。

【0023】図2は、ショートパスフィルタ2の使用効果を示す特性図である。図2(a)はショートパスフィルタ2を使用することなく、泳動を行ったときの検出波形とラマン輝度を示す特性図である。図示されているように、波長約650nmのLDサイドバンドが検出され、同様な波長を有する蛍光は分離されないばかりか、波長約800nm付近のピークのラマン輝度は約40int.程度に弱められてしまう。これに対して、図2(b)に示されるように、ショートパスフィルタ2を使用して泳動を行うと、波長637nmの本来の励起光と波長650nmの蛍光とが明確に分離されるばかりか、波長約800nm付近のピークのラマン輝度も100int.にまで増大する。従って、ショートパスフィルタ2の使用による、ラマン輝度の上昇効果は約2.5倍であることが理解できる。なお、波長637nmの励起光が同時に検出されるのは、この波長の励起光の一部がロングパスフィルタ9を透過し、迷光としてCCDセンサに受光されるためである。しかし、この波長の迷光は、波長650nmの本来の蛍光と明確に区別することができるので、測定結果に悪影響を及ぼすことはない。

【0024】図3は、図1に示される本発明によるDNA塩基配列決定装置の一部切欠部分概要正面図である。キャビリティ5の一端は下部バッファ槽60内のバッファ液に浸漬され、他端はサンプル供給ユニット61のサンプルトレイ62の上部バッファ槽62-1内のバッファ液に浸漬されている。下部バッファ槽60及び上部バッファ槽62-1には高圧電源63から高電圧が印加される。例えば、下部バッファ槽60に-15kVの負電圧

を印加する。上部バッファ槽62-1は接地されている。電気泳動中、キャビリティ5内のゲル電解質の温度を一定に保持するため、キャビリティ5の背後には温調用のヒータユニット64が配設されている。ヒータユニット64の所定箇所には窓が開けられ、この窓に位置に対応して図1に示される蛍光集光系6が配設されている。キャビリティ5はこの窓のところで、蛍光集光系6と正対するように位置決めされている。

【0025】図4はサンプルトレイ62の上面図である。図示されているように、サンプルトレイ62は円盤状であり、サンプル供給ユニット61に装着されると、時計方向及び反時計方向に回転可能に構成されている。符号62-1は上部バッファ槽を示し、符号62-2は泳動終了後にキャビリティ内のゲル電解質及びDNAサンプルを廃棄するための“ゴミ溜”である。符号62-3は予備の上部バッファ槽であり、符号62-4は予備の“ゴミ溜”である。蛍光標識されたDNA断片サンプルは符号62-5~62-nで示される穴に装備される。上部バッファ槽、“ゴミ溜”及び蛍光標識DNA断片サンプルはそれぞれのプラスチックチューブを、符号62-1~62-nで示される各穴に挿入する態様で使用することもできる。

【0026】再び図3を参照する。ゲル電気泳動が終了すると、サンプル供給ユニット61が下降し、キャビリティ5を上部バッファ槽62-1から抜き出す。次いで、サンプル供給ユニット61が所定角度だけ回転し、その後、再び上昇し、キャビリティ5を“ゴミ溜”62-2内に挿入する。ストップ65でキャビリティ5の一端を閉じ、ゲル電解質注入用シリンジ66のピストンを下降させると、キャビリティ5内部のゲル電解質及びDNA断片サンプルは開放されている他端から“ゴミ溜”62-2内に排出される。次いで、この状態でゲル電解質注入用シリンジ66に新鮮なゲル電解質を充填し、ピストンを下降させると、空になったキャビリティ5の内部に新鮮なゲル電解質が満たされる。その後、サンプル供給ユニット61が下降し、キャビリティ5を“ゴミ溜”62-2から抜き出す。次いで、サンプル供給ユニット61が所定角度だけ回転し、その後、再び上昇し、キャビリティ5を所定位置の区画62-mにおけるDNA断片サンプルが充填されたチューブ内へ挿入し、ゲル電解質注入用シリンジ66のピストンを上昇させることによりサンプルを吸引する。その後、サンプル供給ユニット61を下降させ、上部バッファ槽62-1の位置まで回転させ、次いで、上昇させ、キャビリティ5の他端を上部バッファ槽62-1内に挿入し、上部バッファ液に浸漬させる。これでサンプルローディングが完了する。ストップ65をリリースし、高圧電源63から電圧を印加すると、新たなゲル電気泳動が開始される。これらの一連の動作はプログラム化して適当なメモリに記憶させ、全て自動的に行わせることができる。このような自動化手段は当業者に

公知である。

【0027】

【発明の効果】以上説明したように、本発明によれば、LD光源とゲル電気泳動手段との間にショートパスフィルタを配設することにより、LD光源から発生される不要サイドバンドをカットすることができ、その結果、蛍光の分離能が飛躍的に向上するばかりか、ラマン輝度も2.5倍に高めることができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明によるDNA塩基配列決定装置の部分概要構成図である。

【図2】ショートパスフィルタの使用効果を示す特性図である。(a)はショートパスフィルタを使用することなく泳動を行ったときの検出波形とラマン輝度を示す特性図であり、(b)はショートパスフィルタを使用して泳動を行ったときの検出波形とラマン輝度を示す特性図である。

【図3】本発明による単一のキャピラリを用いたDNA塩基配列決定装置の一部切欠概要正面図である。

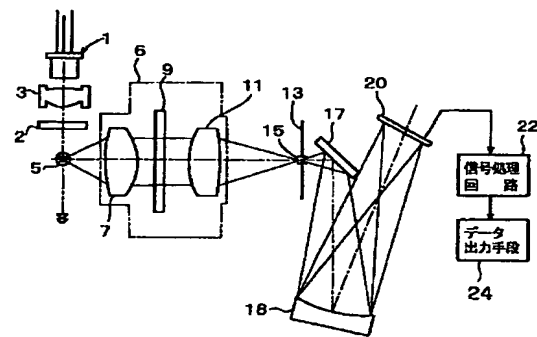
【図4】図3に示される装置で使用されるサンプルトレイの上面図である。

【図5】特開昭63-21556号公報に開示されたDNA塩基配列決定装置の模式的構成図である。

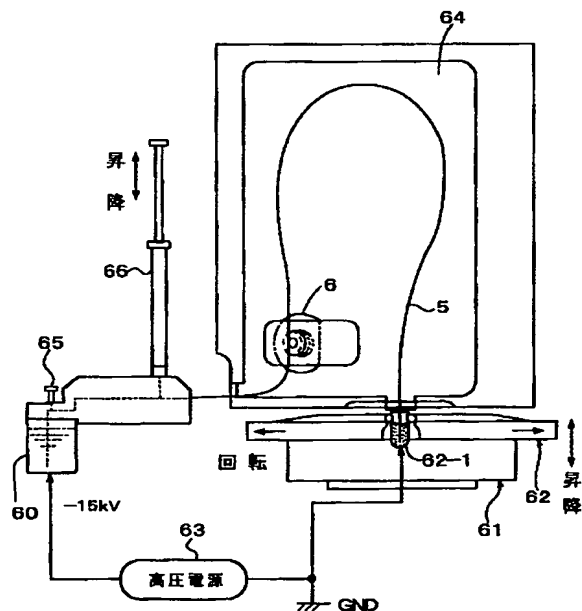
*【符号の説明】

- 1 レーザダイオード
- 2 ショートパスフィルタ
- 3 集光レンズ
- 5 泳動手段
- 7 第1のレンズ
- 9 ロングパスフィルタ
- 11 第2のレンズ
- 13 スリット
- 15 スリット開口部
- 17 反射ミラー
- 18 グレーティング
- 20 CCDセンサ
- 22 信号処理回路
- 24 データ出力手段
- 60 下部バッファ槽
- 61 サンプル供給ユニット
- 62 サンプルトレイ
- 63 高圧電源
- 64 ヒータユニット
- 65 ストップ
- 66 ゲル注入用シリンジ

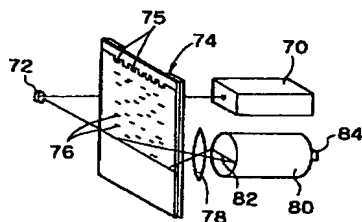
【図1】



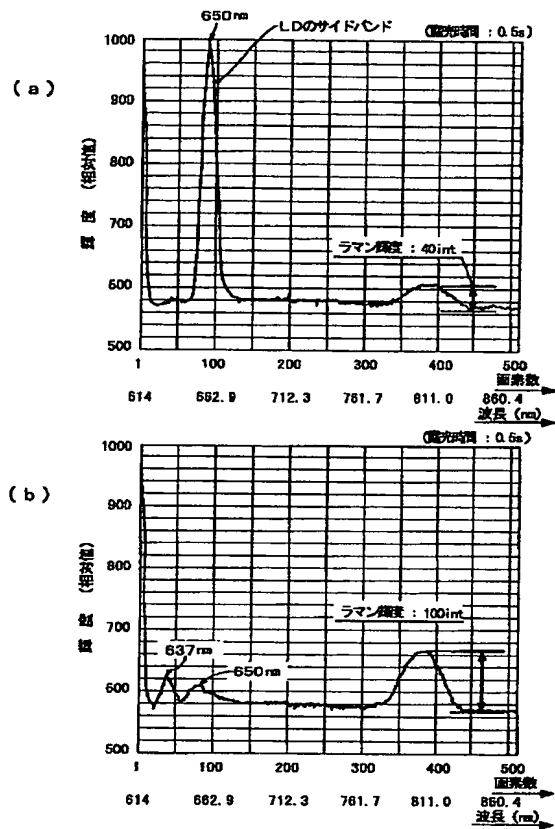
【図3】



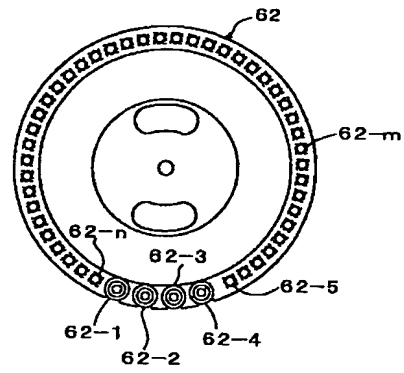
【図5】



【図2】



【図4】



フロントページの続き

F ターム (参考) 2G043 AA03 AA04 BA16 CA03 DA02
EA01 EA03 EA19 GA08 GB07
HA01 HA02 JA03 JA04 KA05
LA03 MA01 MA11